

PCT/EP 98 / 07 557

11 17 10 98

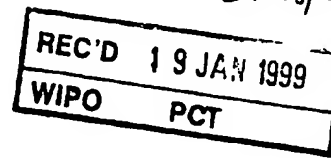


Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

CP 98/07557



EAJK

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-
gen stimmen mit der
ursprünglich eingereichten
Fassung der auf dem näch-
sten Blatt bezeichneten
europäischen Patentanmel-
dung überein.

The attached documents
are exact copies of the
European patent application
described on the following
page, as originally filed.

Les documents fixés à
cette attestation sont
conformes à la version
initialement déposée de
la demande de brevet
européen spécifiée à la
page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

98102095.1

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

M.B. RIJLING

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE

18/11/98

BEST AVAILABLE COPY



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

14 17 12 98

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.
Application no
Demande n°. 98102095.1

Anmeldetag
Date of filing
Date de dépôt 06/02/98

Anmelder
Applicant(s)
Demandeur(s)
BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
68305 Mannheim
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung
Title of the invention
Titre de l'invention:

Aktive Hedgehog-Protein-Mutante, Verfahren zur Herstellung und Verwendung

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat
State
Pays

Tag
Date
Date

Aktenzeichen
File no
Numéro de dépôt

Internationale Patentklassifikation
International Patent classification
Classification internationale des brevets.

C12N15/00

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten
Contracting states designated at date of filing AT/BE/CH/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LU/LC/NL/PT/SE
Etats contractants désignés lors du dépôt

Bemerkungen
Remarks
Remarques

11.17.12.99

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH

4844/0A/EP

Aktive Hedgehog-Protein-Mutante, Verfahren zur Herstellung und Verwendung

Gegenstand der Erfindung ist eine aktive Form eines Hedgehog-Proteins, Verfahren zu dessen rekombinanter Herstellung und dessen therapeutische Verwendung. Unter Hedgehog (hh)-Proteinen versteht man eine Familie von sekretierten Signalproteinen, die verantwortlich sind für die Ausbildung einer Vielzahl von Strukturen in der Embryogenese (J.C. Smith, Cell 76 (1994) 193 - 196, N. Perrimon, Cell 80 (1995) 517 - 520, C. Chiang et al., Nature 373 (1996) 407, M.J. Bitgood et al., Curr. Biol. 6 (1996) 296, A. Vortkamp et al., Science 273 (1996) 613, C.J. Lai et al., Development 121 (1995) 2349). Bei der Biosynthese wird nach Abspaltung der Signalsequenz und autokatalytischer Spaltung eine 20 kD N-terminale Domäne und eine 25 kD C-terminale Domäne erhalten. Das N-terminale Fragment ist Cholesterin-modifiziert (J.A. Porter et al., Science 274 (1996) 255 - 259). In höheren Lebewesen besteht die hh-Familie zumindest aus drei Mitgliedern, nämlich Sonic, Indian und Desert hh (Shh, Ihh, Dhh; M. Fietz et al., Development (Suppl.) (1994) 43 - 51). Für Hedgehog-Proteine, welche rekombinant hergestellt wurden, wurde eine unterschiedliche Aktivität nach Herstellung in Prokaryonten und Eukaryonten beobachtet (M. Hynes et al., Neuron 15 (1995) 35 - 44 und T. Nakamura et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 237 (1997) 465 - 469).

Hynes et al. vergleichen die Aktivität von hh im Überstand von transformierten "human embryonic kidney 293 cells" (eukaryontischer hh) mit aus E.coli hergestellten und aus dem Cytoplasma isolierten hh und finden eine vierfach höhere Aktivität des hh aus den Überständen der Nierenzelllinie. Als Ursache dieser erhöhten Aktivität wird ein potentieller zusätzlicher "accessory factor", der nur in eukaryontischen Zellen exprimiert wird, eine posttranslationale Modifikation, ein unterschiedlicher N-Terminus, der aus E.coli isolierte hh enthält 50 % eines hhs, welcher zwei zusätzliche N-terminale Aminosäuren (Gly-Ser) trägt, oder um 5 - 6 Aminosäuren verkürzt ist, oder in einem höheren Aggregatzustand (z. B. durch Bindung an Nickel-Agarose beads) diskutiert.

Nakamura et al. vergleichen die Aktivität von shh im Überstand von transformierten "chicken embryo fibroblasts" mit einem aus E.coli isolierten shh Fusionsprotein, das noch einen N-terminalen Polyhistidinteil aufweist. Das shh im Überstand der Fibroblasten hat bezüglich der Stimulation von alkalischer Phosphatase (AP) in C3H10T 1/2 Zellen eine 7fach höhere

M 17. 12. 98

- 2 -

Aktivität als das gereinigte E.coli Protein. Als Ursache der erhöhten Aktivität werden Moleküle, wie beispielsweise bone morphore genic Proteins (BMPs) diskutiert, die nur im Überstand von eukaryontischen Zellen vorhanden sind und die stärkere Induktion der AP verursacht.

Von Kinto et al., FEBS Letters, 404 (1997) 319 - 323 wurde beschrieben, daß hh sekretierende Fibroblasten bei i.m. Implantation auf Kollagen eine ektopische Knochenbildung induzieren.

Aufgabe der Erfindung ist es, hh-Proteine (Polypeptid) herzustellen, welche eine deutlich verbesserte Aktivität gegenüber den bekannten Formen zeigen.

Die Aufgabe wird gelöst durch eine posttranslational prozessierte Hedgehog-Protein-Mutante (hh-Mutante), welche erhältlich ist durch Expression eines Gens, welches ein Hedgehog-Protein codiert in einem Bacculo-Virus-Expressionssystem, bei einer Fermentation über einen Zeitraum von bis zu ca. 30 Stunden, vorzugsweise von 24 - 27 Stunden, Reinigung des Zellüberstands in Gegenwart eines Proteaseninhibitors und eines nicht-ionischen Detergenz und Isolierung der hh-Mutante, welche an Heparinsepharose und Hydroxylapatit bindet und dadurch gekennzeichnet ist, daß diese hh-Mutante

- unter alkylierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 22 ± 1 kDa zeigt,
- unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 24 ± 1 kD zeigt,
- in ihrer Aktivität durch Suramin stabilisiert wird,
- bei einer N-terminalen Abspaltung von 8 oder mehr Aminosäuren inaktiviert wird,
- bei einer Inkubation mit 10 mmol/l 1,4 Dithioerythrit (DTE) über 2,5 Stunden bei 37°C zu 90 % oder mehr inaktiviert wird,
- in einer Konzentration von 5 nmol/l, in Gegenwart von Suramin, eine Aktivität für alkalische Phosphatase von ca. 90 nmol pNP/min/mg induziert und
- nicht cholesterinmodifiziert ist.

Unter Aktivität im Sinne der Erfindung ist die Aktivität an alkalischer Phosphatase zu verstehen, die das Polypeptid in Säugerzellen induzieren kann (Aktivität im alkalischen Phosphataseset). Dabei wird eine Maus-Fibroblasten-Zelllinie in einem Medium, welches fötales Kälberserum enthält, kultiviert. Anschließend wird sterilfiltrierte Probe zugesetzt, nach ca. 5 Tagen die Zellen aufgeschlossen und in Zellysat alkalische Phosphatase über die Spaltung

eines chromogenen Substrats (pNP, p-Nitrophenol) bestimmt (J. Asahina, Exp. Cell. Res. 222 (1996) 38 - 47 und T. Nakamura (1997)).

Unter einem Bacculo-Virus-Expressionssystem ist ein Expressionssystem bestehend aus einem Bacculo-Virus-Vektor und einer Insektenzelle als Wirtszelle zu verstehen. Solche Expressionssysteme sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise für hh-Proteine von Bumcrot (1995) beschrieben.

Unter einem Hedgehog-Protein, gemäß der Erfindung, ist ein sekretiertes Signalprotein zu verstehen, welches für die Ausbildung einer Vielzahl von Strukturen in der Embryogenese verantwortlich ist. Besonders bevorzugt verwendet wird Sonic, Indian- oder Desert hh (M. Fietz et al. (1994). Bevorzugt wird ein hh-Protein einer Sequenz, wie sie in der EMBL-Datenbank unter Nr. L38518 beschrieben ist, verwendet. Proteine der Hedgehog-Familie zeigen eine ausgeprägte Homologie in der Aminosäuresequenz, weshalb es ebenso bevorzugt ist, solche Nukleinsäuren zu exprimieren, welche für Hedgehog-Proteine codieren, die zu 80 % oder mehr homolog mit der oben genannten Sequenz von Sonic Hedgehog-Protein sind.

Das Sonic Hedgehog-Precursorprotein besteht aus den Aminosäuren 1 - 462 der in der EMBL-Datenbank unter Nr. L38518 beschriebenen Sequenz. Die Aminosäuren 1 - 23 stellen dabei das Signalpeptid dar, die Aminosäuren 24 - 197 die mature Signaldomäne, die Aminosäuren 32 - 197 die um acht Aminosäuren verkürzte Signaldomäne und die Aminosäuren 198 - 462 die autoprozessierte Domäne nach autoproteolytischer Spaltung.

Unter den ersten acht Aminosäuren des Hedgehog-Proteins sind gemäß der Erfindung die ersten acht Aminosäuren des prozessierten Proteins, beispielsweise für Sonic Hedgehog-Protein, die Aminosäuren 24 - 31 zu verstehen.

Überraschenderweise wird bei der rekombinanten Herstellung von Hedgehog-Proteinen im Bacculo-Virus-Expressionssystem eine hochaktive Mutante des Proteins (Aktivität gegenüber shh mindestens um das 10fache, vorzugsweise mindestens um das 100fache erhöht) in der Anfangszeit der Fermentation angereichert. Insgesamt beträgt der Anteil der hochaktiven erfindungsgemäßen hh-Mutante jedoch lediglich etwa 2 - 5% des gesamten hh-Proteinspektrum nach Expression im Bacculo-Virus-Expressionssystem. Diese erfindungsgemäße Mutante des Polypeptids kann insbesondere dann isoliert werden, wenn die Fermentation spätestens nach ca. 30 Std., vorzugsweise nach ca. 24 - 27 Std.,

abgebrochen wird. Dies ist auch deshalb überraschend, da für die Herstellung von hh-Proteinen im Bacculo-Virus-Expressionssystem bisher eine Fermentationszeit nach Infektion von mindestens 2 Tagen beschrieben wird (Bumcrot et al., Mol. Cell. Biol. (1995) 2294 - 2303). Auch für andere Proteine, die im Baculovirussystem hergestellt werden, wie beispielsweise Rhodopsin Kinase (Cha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 10577 - 10582) ist beschrieben, daß nach 64 - 88 Std. ein Maximum an Protein und Aktivität erzielt wird. Erfindungsgemäß wurde für Hedgehog-Proteine gefunden, daß im Fermentationsüberstand zwar die Menge an Hedgehog-Protein im Zeitraum zwischen 33 und 72 Stunden zwar stark zunimmt, in diesem Zeitraum jedoch nur hh-Protein mit einer Aktivität wie sie aus dem Stand der Technik bekannt ist entsteht. Dagegen ist bei einer reduzierten Fermentationszeit von unter ca. 30 Std. der Anteil an solchem hh-Protein wesentlich (mindestens 5 - 10fach) geringer, wodurch sich die erfindungsgemäße hochaktive hh-Proteinmutante identifizieren und isolieren läßt.

Das Molekulargewicht der erfindungsgemäßen Mutante beträgt $19.796,7 \pm 2 \text{ D}$ bei Analyse mittels MALDI-Massenspektroskopie und ist gegenüber unmodifiziertem hh-Protein (in E.coli cytoplasmatisch exprimiertes hh-Protein) um $236,7 \pm 2 \text{ D}$ erhöht. Durch die hydrophobe Modifikation wird die Mobilität in der SDS-PAGE durch verstärkte SDS-Bindung erhöht, so daß apparent ein unter alkylierenden Bedingungen (hh-Protein derivatisiert) ein geringeres Molekulargewicht als unter reduzierenden Bedingungen (hh-Protein ohne Derivatisierung) erkennbar ist.

Die erfindungsgemäße hh-Mutante zeigt nach Reinigung mit der Ionenaustausch-Chromatographie gegenüber löslich in Cytoplasma exprimiertem hh-Protein aus E.coli eine um mindestens den Faktor 100, vorzugsweise eine um den Faktor 10^3 bis 10^6 erhöhte Aktivität, gemessen über die Induktion von alkalischer Phosphatase im Zelltest (Aktivität im AP-Zelltest). Eine solche aktive hh-Mutante ist nicht cholesterinmodifiziert wie das von J.A. Porter beschriebene N-terminale hh-Fragment. Die erfindungsgemäße hh-Mutante liegt in einer biologisch aktiven, dreidimensionalen Struktur vor. Erfindungsgemäß ist es demnach zum ersten Mal gelungen, hochaktives Hedgehog-Protein zu isolieren und einen allgemeinen, reproduzierbaren Weg zur Herstellung und Charakterisierung von hochaktiven Hedgehog-Proteinen zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung sind demnach Hedgehog-Proteine mit einer mindestens um den Faktor 100, vorzugsweise um den Faktor 10^3 bis 10^6 erhöhten Aktivität im Vergleich zu dem entsprechenden Hedgehog-Protein, welches cytoplasmatisch in E.coli hergestellt wurde,

11.17.12.98

- 5 -

wobei die Aktivität über die Induktion von alkalischer Phosphatase im Zelltest bestimmt wird.

Unter entsprechendem Hedgehog-Protein, welches cytoplasmatisch in E.coli hergestellt wurde, ist erfindungsgemäß ein Hedgehog-Protein zu verstehen, welches nach Expression in E.coli in löslicher Form aus dem Cytoplasma isoliert wird. Als Expressionsvektor wird dabei ein Vektor verwendet, welcher eine zu exprimierende Nukleinsäure enthält, die für ein Hedgehog-Protein der gleichen Aminosäuresequenz codiert wie die zu exprimierende Nukleinsäure des Expressionsvektors, der für die Expression im Bacculo-Virus-Expressionssystem verwendet wird. Dabei kann es allerdings zweckmäßig sein, die ein oder andere Aminosäure im Bacculovektor oder E.coli-Vektor zu ändern, beispielsweise, um die Expression oder die Löslichkeit zu verbessern. Für den Vergleich der Aktivitäten des erfindungsgemäßen Hedgehog-Proteins mit dem E.coli-Protein ist es jedoch zweckmäßig, Expressionsvektoren für identische Proteine zu verwenden.

Die erfindungsgemäße hh-Mutante ist sehr sensibel gegen Proteasen, weshalb es bevorzugt ist, den Überstand der Fermentation Proteaseninhibitoren, wie beispielsweise Aprotinin, PMSF oder Pepstatin oder ein Gemisch davon, zuzusetzen.

Weiter ist es bevorzugt, bei der Reinigung nicht-ionische Detergentien, wie beispielsweise Polysorbat (z.B. Triton® X 100), zuzusetzen, da dadurch die erfindungsgemäßen hh-Proteine ebenfalls stabilisiert werden, vorzugsweise, zumindest nach der ersten Grobreinigung, über Heparin-Sepharose.

In einem ersten Schritt zur Reinigung des erfindungsgemäßen Proteins wird zweckmäßig eine Chromatographie an Heparin-Sepharose durchgeführt. Es ist bevorzugt, diese Chromatographie als Stufenelution durchzuführen, d.h. vorzugsweise nach Waschen mit 250 mmol/l NaCl, bei einer Konzentration von mindestens 0,7 mol/l (vorzugsweise 1,2 mol/l) zu eluieren.

Zur Aufreinigung der erfindungsgemäßen hh-Mutante ist es besonders vorteilhaft, eine Hydroxylapatit-Chromatographie durchzuführen. Dadurch wird eine gute Anreicherung der Aktivität bei relativ geringen Verlusten (<50 %) erreicht. Weitere Chromatographieschritte, die zweckmäßig sind, sind beispielsweise eine Heparinsepahrose-Chromatographie (Miao et al., J. Neurosci. 17 (1997) 5891 - 5899), die jedoch vorzugsweise in Gegenwart von nicht-ionischen Detergentien durchgeführt wird. Weiter bevorzugt ist es, nach der Heparinsepahrose-Chromatographie eine Dialyse, vorzugsweise gegen niedere Ionenstärken (z. B. Puffer

mit 1 - 10 mmol/l Natriumphosphat, pH 6,5 - 7,5), durchzuführen. Besonders vorteilhaft ist es hierbei, daß bei dieser Dialyse der Puffer, gegen den dialysiert wird, 10 - 100 mmol/l, vorzugsweise 50 mmol/l Natriumchlorid enthält und die Dialyse bei einer geringen Konzentration des hh-Proteins (1 mg/ml oder geringer, vorzugsweise 0,5 mg/ml oder geringer) durchgeführt wird.

Es ist weiter bevorzugt, bei der Reinigung oder zumindest vor Bestimmung der Aktivität des Proteins Suramin zuzusetzen. Dadurch wird ebenfalls eine Stabilisierung der Aktivität erreicht. Für Suramin war bisher lediglich bekannt, daß es geeignet ist, hh-Proteine von der Zelloberflächen- oder der extrazellulären Matrix abzulösen (Buncrot et al., siehe oben).

Zur weiteren Reinigung ist es bevorzugt, nochmals an Heparin-Sepharose und Hydroxylapatit zu chromatographieren.

Zur weiteren Reinigung ist es bevorzugt, eine Ionenaustausch-Chromatographie mit Poros-HS/M und/oder Poros-Q sowie vorzugsweise anschließend eine RP-HPLC durchzuführen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die erfindungsgemäße hh-Mutante zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist, verwendet werden. Diese pharmazeutische Zusammensetzung enthält eine pharmakologisch effektive Dosis des erfindungsgemäßen Proteins und kann sowohl systemisch als auch lokal appliziert werden. Es ist ebenfalls bevorzugt, die erfindungsgemäßen Proteine in Kombination mit anderen Proteinen der Hedgehog-Familie oder Knochenwachstumsfaktoren, wie Bone Morphogenic Proteinen (BMPs), (Wozney et al., Cell. Mol. Biol. of Bone, Bone Morphogenetic Proteins and their Gene Expression, 131 - 167, Academic Press Inc. 1993) oder Parathyroid Hormonen (Karablis et al., Genes and Development 8 (1994) 277 - 289).

Das erfindungsgemäße Protein kann vorteilhaft zur Induktion von Chondrozyten und Osteozyten in einer osteoinduktiven pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet werden. Solche osteoinduktiven pharmazeutischen Zusammensetzungen sind beispielsweise aus US-Patent 5,364,839, WO 97/35607, WO 95/16035 bekannt.

Bei einer lokalen Applikation des erfindungsgemäßen Proteins ist bevorzugt, dieses in Kombination mit einer geeigneten Matrix als Träger und/oder einem Sequestrierungssagen zu verwenden. Eine solche Matrix ist dazu geeignet, das Protein, insbesondere in der Umgebung

M 17.12.98

- 7 -

von Knochen, in vivo langsam in aktiver Form freizusetzen. Das Sequestrierungsagens ist eine Substanz, welche die Applikation, beispielsweise durch Injektion, erleichtert und/oder die Migration des erfindungsgemäßen Proteins von der Applikationsstelle verhindert oder zumindest verzögert.

Als Matrixmaterial ist insbesondere ein biokompatibles degradierbares Material, beispielsweise auf Kollagenbasis oder anderen Polymeren, basierend auf Polymilchsäure, Polyglykolsäure oder Co-Polymeren aus Milchsäure und Glykolsäure geeignet. Solche Polymermatrices sind beispielsweise in der WO 93/00050 beschrieben.

Sequestrierungsagentien sind beispielsweise Cellulose und celluloseartige Materialien sowie beispielsweise Alkylcellulose, Carboxymethylcellulose, Hyaluronsäure, Natriumalginat, Polyäthylenglykol und Polyvenylalkohol, wobei Hyaluronsäure, insbesondere in einer pharmazeutischen Zusammensetzung auch ohne Trägermatrix, besonders bevorzugt ist.

Zur Herstellung der pharmazeutischen Zusammensetzung ist es weiter bevorzugt, Hilfsstoffe, wie Mannitol, Sucrose, Laktose, Glucose oder Glycin sowie Antioxidantien, wie EDTA, Citrat und Detergentien, vorzugsweise nicht-ionische Detergentien, wie Polysorbate oder Polyoxyethylene, zuzusetzen. Ebenfalls bevorzugt ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die im pH-Bereich pH 4 – 8 gepuffert ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist eine pharmazeutische Zusammensetzung des erfindungsgemäßen Hedgehog-Proteins mit Suramin bevorzugt und diese vorteilhaft verwendbar.

Die folgenden Beispiele, Publikationen und Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

Beschreibung der Figuren:

Fig. 1: Kinetik der Sekretion von alkalischer Phosphatase induzierender Aktivität (Balken) und hh-Mutante (Punkte und Linie) durch High Five Zellen nach Infektion mit Baculovirus

- Fig. 2:** Elutionsdiagramm der Reinigung des Fermentationsüberstandes mit Heparinsepharose
- Fig. 3:** Elutionsdiagramm der Reinigung des dialysierten Eluates der Heparin-Sepharose mit Hydroxylapatit
- Fig. 4:** Elutionsdiagramm der Reinigung der dialysierten aktiven Fraktionen der Hydroxylapatit-Säule mit einer 1 ml HiTrap Heparin-Säule
- Fig. 5:** Alkalische Phosphatase induzierende Aktivität der Fraktionen 1 ml High Trap Heparin Chromatographie
- Fig. 6:** Coomassie-Färbung der SDS-PAGE mit alkylierten Fraktionen der 1 ml High Trap Heparin Chromatographie
- Fig. 7:** Western blot mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von shh der SDS-PAGE mit alkylierten Proben der Fraktionen der 1 ml High Trap Heparin Chromatographie
- Fig. 8:** Western blot mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von shh der SDS-PAGE mit reduzierten Proben der Fraktionen der 1 ml High Trap Heparin Chromatographie
- Fig. 9:** Aktivität von Retentat und Permeat nach Filtration von aktiven shh Fraktionen mit Membranen mit einer Ausschlußgrenze von 30 und 100 kDa.
- Fig. 10:** Einfluß von Suramin auf die Aktivität der hh-Mutante: Zu Aliquots einer aktiver Fraktionen nach Hydroxylapatit-Chromatographie wurde kein Suramin (B), Suramin ad 0,1 mg/ml erst nach der Dialyse gegen PBS+0,05 % Tween[®]-80 zugegeben (C) oder Suramin ad 0,1 mg/ml vor der Dialyse zugegeben und gegen PBS+0,05 % Tween[®]-80 mit zusätzlich 0,1 mg/ml Suramin dialysiert.
- Fig. 11:** Einfluß von Tween-20 und Tween-80[®] auf die Aktivität der hh-Mutante: Aliquots eines Pools AP aktiver Fraktionen nach SP-Sepharose-Chromatographie in 50 mM NaPi, 0,9 M NaCl, 1 mM EDTA pH 7,3 wurden zu den angegebenen Konzentrationen mit Tween versetzt und gegen PBS mit der jeweiligen Konzentra-

tion an Tween dialysiert. Vor dem Einsatz in den C3H10T1/2-Test wurden die Proben durch 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

Fig. 12: Einfluß von Trypsin und Chymotrypsin auf die Aktivität der hh-Mutante:

AP aktive Fraktionen nach Stufenelution von Heparin-Sephrose wurden in 10 mM NaPhosphat, 0,05% Tween[®]80 auf eine Proteinkonzentration von 0,46 mg/ml eingestellt und im Protease/Protein-Verhältnis (w/w) von 1:100 (A), 1:500 (B), 1:2500 (C) und 1:10000 (D) mit Trypsin , bzw. Chymotrypsin versetzt. Die Proben wurden 11 h bei RT inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von Aprotinin im 5-fachen Gewichtsüberschuß gestoppt und die Proben in der SDS-PAGE (A:) und im C3H10T1/2 -Test (B:) analysiert. 1, Einsatz; 2, Kontrolle ohne Protease; 3, Trypsin behandelte Proben; 4, Chymotrypsin behandelte Proben; 5, Kontrolle Trypsin (1:100) und Aprotinin bei t = 0; 6, Kontrolle Chymotrypsin (1:100) und Aprotinin bei t = 0.

Fig. 13: Elutionsdiagramm der Reinigung der dialysierten aktiven Fraktionen der Hydroxylapatit-Säule mit einer 1,7 ml Poros HS/M-Säule.

Fig. 14: Elutionsdiagramme der Auftrennung der aktiven Fraktionen der Poros HS/M-Säule mittels RP-HPLC.

A: Elutionsdiagramm von 10 bis 75 Min. detektiert bei 220 nm.

B: Elutionsdiagramm von 15 bis 40 Min. detektiert bei 280 nm.

Fig. 15: Elutionsdiagramm der Reinigung der dialysierten aktiven Fraktionen der Hydroxylapatit-Säule mit einer 6 ml Poros Q-Säule.

Fig. 16: Stabilität der Alk.Phos. induzierenden Aktivität gegenüber Dithiothreitol.

Fig. 17: Stabilität der Alk.Phos. induzierenden Aktivität gegenüber Hydroxylamin.

Fig. 18: MALDI-Massenspektren des aktiven, modifizierten hh-Derivates.

Beispiel 1

Expression von rekombinanten humanen sonic hh (shh)

Die N-terminale Domäne von humanem shh mit den Aminosäuren 24 -197 (EMBL-Accession No. L 38518) wurde wie für das Rattenprotein von Miao (J. Neurosci. (1997) 17, 5891-5899) und Bumcrot et al. (Mol.Cell.Biol. (1995) 15, 2294-2303) beschrieben mittels rekombinanten Baculovirus in High Five Zellen (Invitrogen, Leek, NL, Best.Nr. E 855-02) unter Verwendung von Excell 400 Medium (JHR, Inc.), wobei so viel Virus eingesetzt wurde, daß jede Zelle im Durchschnitt mit einem Virus infiziert wurde (multiplicity of infection (m.o.i.): 1).

Der Fermenterinhalt wurde nach 26 bzw. 72 h durch Zentrifugation mit 1000 g und Filtration geklärt und der Überstand bzw. das Permeat bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Proben der Fermentation wurden bzgl. ihrem Gehalt an Alkalische Phosphatase induzierender Aktivität [Nakamura et al.(1997), Kinto et al. (1997) FEBS Lett. 404, 319-323] und auf ihren Gehalt an shh Protein mittels RP-HPLC (Vydac C18, Gradient von 0-90% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure, TFA) oder SDS-PAGE analysiert.

Nach 24-32 h (bevorzugt nach 24 - 27 h) Fermentationszeit wurde die Fermentation beendet und der Überstand geklärt.

Beispiel 2

Reinigung der aktiven hh-Mutante an Heparin-Sepharose und Hydroxyapatit

Der geklärte Überstand wurde nach dem Auflauen mit 1 Tablette "Complete" Inhibitor-Mix (Boehringer Mannheim, GmbH, Best.Nr. 1873580) je 50 ml Überstand verstetzt und 3,5 l dieser Lösung bei 4°C auf eine Heparin-Sepharose-Säule (Volumen 90 ml; Pharmacia Biotech) aufgetragen, die zuvor mit 20 mM Natriumphosphat, pH 7,2 äquilibriert worden war. Nach dem Probenaufrag wurde mit 20 mM Natriumphosphat, 0,05 % Tween®-80, pH 7,2 (=Puffer A) gespült und unspezifisch gebundenes Protein durch einen Waschschrift mit Puffer A, der zusätzlich 0,25 M NaCl enthält, eluiert. Die Aktivität erfolgte durch eine anschließende Elution mit Puffer A, der zusätzlich 1,2 M NaCl enthält.

Dieses Eluat wurde anschließend mit einem Volumen 10 mM Natriumphosphat, 0,05 % Tween-80®, 50 mM NaCl, pH 7,2 (=Puffer B) verdünnt und gegen Puffer B bei 4°C dialysiert.

Das Dialysat wurde auf eine mit Puffer B äquilibrierte Hydroxyapatit-Säule (Volumen 10 ml; Makro Prep; 40 µm, Typ I; BIO-Rad) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 10 bis 300 mM NaP in Puffer B (2 x 200 ml).

Aliquots der Fraktionen wurden bzgl. der Fähigkeit zur Stimulation von alkalischer Phosphatase in einer Maus-Fibroblasten Zelllinie, z. B. C3H10T1/2 Zellen sowie mittels SDS-PAGE und RP-HPLC analysiert. Der Rest der Fraktionen wurde bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Maximale Aktivität eluiert am Ende des Gradienten zwischen 0,25-0,3 M Natriumphosphat, während inaktive oder nur schwach aktive Formen von shh bereits schon wesentlich früher von der Säule eluieren.

Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und gegen Puffer B bei -4°C dialysiert und auf eine 1 ml HiTrap Heparin-Säule (Pharmacia Biotech) aufgetragen, die mit 20 mmol Kaliumphosphat, 0,05 Tween[®]80, pH 7,2 äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten von 0 - 1400 mM KCl in 20 mM Kaliumphosphat, 0,05 % Tween[®]-80, 50 mM NaCl, pH 7,2. Aktive Fraktionen wurden durch die Stimulation von alkalischer Phosphatase in C3H10T1/2 Zellen identifiziert und alkylierte und reduzierte Proben mittels SDS-PAGE und Western blot, mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von shh, analysiert.

Im Gegensatz zu inaktiven Fraktionen, enthalten die aktiven Fraktionen eine hh-Mutante, die unter alkylierenden Bedingungen ein um 1-3 kDa reduziertes Molekulargewicht im Vergleich zu nur schwach aktiven shh mit intakten N-Terminus zeigen. Unter reduzierenden Bedingungen hingegen ist ein derartiger Molekulargewichtsunterschied nicht nachweisbar.

Beispiel 3

Reinigung der aktiven hh-Mutante an Kationenaustauscher und RP-HPLC

(1) Reinigung über Kationenaustausch-Chromatographie an PorosHS/M:

Die aktiven Fraktionen aus Beispiel 1 wurden vereinigt und gegen 50 mM Kaliumphosphat, 0,05% Tween[®]80, pH 7,2 (= Puffer C) und auf eine 1,7 ml Poros[®] HS/M -Säule aufgetragen, die in Puffer C äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten mit 40 Säulenvolumen von 0 - 1000 mM KCl in Puffer C und einer Flußrate von 3 ml/min. Aktive Fraktionen wurden durch die Stimulation von alkalischer Phosphatase in C3H10T1/2 Zellen identifiziert. Die aktiven Fraktionen eluierten mit einer Salzkonzentration von ca. 400 - 700

mM KCl und die alkylierten Proben hatten eine Reinheit von mindestens 50% in der SDS-PAGE, während der überwiegende Teil der Proteine bereits bei einer Salzkonzentration von ca. 80 - 400 mM KCl eluierte. Eine Identifizierung des in diesen Fraktionen enthaltenen hochaktiven hh-Derivates ist durch anschließende RP-HPLC und Massenanalyse des Elutionspeaks möglich.

(2) Reinigung über RP-HPLC:

Zur weiteren Reinigung wurde mit aktiven Fraktionen der Poros[®]-HS/M-Chromatographie eine RP-HPLC durchgeführt. Dazu wurden 3,2 ml einer hochaktiven Fraktion auf eine 2.1 x 150 mm Butyl-Säule (Vydac[™] 214TP5215) aufgetragen, die in 20% Acetonitril, 0.1% Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte bei 25°C im Gradienten von 20 - 90% Acetonitril in 0.1% TFA und wurde durch Detektion der Absorption bei 220 nm und 280 nm analysiert. Im Vergleich zu schwach aktiven, unmodifizierten monomeren oder dimeren hh-Formen eluiert das angereicherte hochaktive hh-Derivat erst mit einer etwas höheren Konzentration an Acetonitril (ca. 41,2%). Diese Spezies wurde gesammelt und deren Masse über MALDI-Massenspektrometrie bestimmt.

(3) Massenanalyse des aktiven hh-Derivates nach RP-HPLC:

Zur Massenanalyse wurde das oben beschriebene RP-Eluat (Gesamtvolumen 200 µl) mit 5 µl 25 mM Sinapinsäure in 30 % (v/v) Acetonitril / 70 % Wasser / 0.1% Trifluoressigsäure versetzt, in einem Speedvac-Konzentrator zur Trockene eingeeengt und in 5 µl 30 % (v/v) Acetonitril / 70 % Wasser / 0.1% Trifluoressigsäure gelöst. 1 µl der so erhaltenen Lösung (im Folgenden als Lösung A bezeichnet) wurde mit 1 µl 25 mM Sinapinsäure in 30 % (v/v) Acetonitril / 70 % Wasser / 0.1% Trifluoressigsäure gemischt, auf das Target aufgebracht, an der Laborluft getrocknet und nach der Trocknung in einem Bruker REFLEX MALDI-Massenspektrometer mit einer sog. 'delayed extraction'-Quelle vermessen. Abgesehen von Alkali- und Matrix-Addukten war in dem so erhaltenen Massenspektrum nur eine molekulare Spezies zu detektieren. Da die Bestimmung der molekularen Masse ohne die Verwendung eines internen Standards lediglich ± 0.03 % beträgt, wurde neben dem Massenspektrum der reinen Lösung A zusätzlich das Massenspektrum eines Aliquots der Lösung A gemessen, das mit einem Protein bekannter Masse versetzt wurde. Dazu wurden 0.5 µl der Lösung A, 0.5 µl einer äquivalent präparierten Lösung eines Heghchog-Moleküls mit einem mittleren Molekulargewicht von 18900.1 D und 1 µl 25 mM Sinapinsäure in 30 % (v/v) Acetonitril / 70 % Wasser / 0.1% Trifluoressigsäure gemischt, auf das Target aufgebracht, an der Laborluft

getrocknet und nach der Trocknung in gleicher Weise massenspektrometrisch vermessen. Die so erhaltenen Spektren (Fig. 18) wurden mit Hilfe der einfach und zweifach geladenen Ionen des zur Aufstockung verwendeten Moleküls kalibriert. Die für die in Lösung A enthaltene aktive Hedgehog-Spezies bestimmten molekularen Massen sind in der folgenden Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1

| Spektrum der Fig. 1 / Signal | Molekulare Masse des aktiven Hedgehog-Moleküls | Differenz zur molekularen Masse des unmodifizierten Hedgehog-Moleküls (19560.0 D) |
|------------------------------|--|---|
| A / MH ⁺ | 19795.6 D | 235.6 D |
| A / MH ⁺⁺ | 19797.6 D | 237.6 D |
| B / MH ⁺ | 19796.3 D | 236.3 D |
| B / MH ⁺⁺ | 19797.2 D | 237.2 D |

Unter Berücksichtigung der Ungenauigkeit der Massenbestimmung von $\pm 0.01\%$ beträgt die Differenz der bestimmten molekularen Masse des aktiven Hedgehog-Moleküls zur molekularen Masse des unmodifizierten Hedgehog-Moleküls 236.7 ± 2 D. Von den bekannten, natürlich vorkommenden kovalenten Protein-Modifizierungen führt lediglich die Veresterung mit C16-Fettsäuren (Palmitinsäure: Massenerhöhung um 238.4 D, einfach ungesättigte Palmitinsäuren: Massenerhöhung um 236.4 D) zu einer Erhöhung der molekularen Masse, die mit der gefundenen Massenerhöhung kompatibel ist.

(4) Reinigung über Anionenaustausch-Chromatographie an Poros[®]-Q:

Zusätzlich oder alternativ zu einer Reinigung mittels Kationenaustausch-Chromatographie an Poros[®]-HS/M ist auch eine Reinigung der HA- oder Heparin-HiTrap-Eluate mittels Anionenaustausch-Chromatographie an Poros[®]-Q möglich. Dazu wurden die aktiven Fraktionen vereinigt, gegen 20 mM Tris/HCl, 0,05% Tween[®]80, pH 9.0 (= Puffer D) dialysiert und auf eine Poros[®]-Q-Säule aufgetragen, die in Puffer D äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte durch einen Gradienten mit 60 Säulenvolumen von 0 - 1000 mM NaCl in Puffer D. Aktive Fraktionen wurden durch die Stimulation von alkalischer Phosphatase in C3H10T1/2 Zellen identifiziert. Aktives hh-Protein eluierte bei einem Salzgehalt von 90 - 175 mM NaCl. Eine

weitere Reinigung und Charakterisierung dieser aktiven Fraktionen ist mittels Poros[®]-HS/M oder RP-HPLC oder SDS-PAGE und Western blot wie oben beschrieben möglich.

Beispiel 4

Stabilität der aktiven hb-Mutante gegenüber reduzierenden Agentien

(1) Stabilität gegenüber Dithiothreitol (DTT):

Das Stufeneluat einer Heparin -Sepharose-Säule mit Puffer A, der zusätzlich 1,2 M NaCl enthielt (s. Beispiel 3) wurde mit 1+1 mit 0.05% Tween[®]80 verdünnt und, für die Proben mit pH 8, mit 1/10 Vol. 1M Tris/HCl, pH8 versetzt. Die Proben wurden ad 0 mM, 1 mM, 10 mM und 50 mM mit DTT versetzt. Nach 2h Inkubation bei 37°C wurden die Proben jeweils mit 1/10 Vol (50 µl) 10 mg/ml BSA versetzt und gegen PBS dialysiert. Vor der Abgabe in den C3H10T½ Zelltest wurde zu jeder Probe ad 0.1 mg/ml Suramin zugesetzt, um die Aktivität zu stabilisieren.

Es zeigt sich, daß die Aktivität bei pH 7,2 bis zu einer Konzentration von 10 mM DTT stabil ist, bei pH 8 führt jedoch schon die Behandlung mit 1 mM DTT zu einer erheblichen Aktivitätsabnahme. Eine solche pH-Abhängigkeit ist für die Reduktion von Schwefel in Disulfidbrücken sowie in Thioestern von Fettsäuren zu erwarten.

(2) Stabilität gegenüber Hydroxylamin (HA):

Das Stufeneluat einer Heparin -Sepharose-Säule mit Puffer A, der zusätzlich 1,2 M NaCl enthielt (s. Beispiel 3), wurde mit NaOH ad pH 8.0, bzw. mit HCl ad pH 5.5 eingestellt. Aliquots dieser Proben wurden jeweils ad 0 mM, 66 mM, 250 mM oder 1 M mit NH₂OH mit entsprechendem pH-Wert versetzt und für 14 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden anschließend gegen 20 mM NaP, 250 mM NaCl, 0.05% Tween80, pH 7.4 dialysiert und vor der Analyse im Zelltest ad 1 mg/ml BSA und ad 0.1 mg/ml Suramin versetzt.

Es zeigte sich, daß die Aktivität bei pH 5,5 gegenüber bis zu 66 mM HA stabil ist, bei pH 8 führt jedoch schon die Behandlung mit 66 mM HA zu einer erheblichen Aktivitätsabnahme. Eine solche pH-Abhängigkeit ist für die Spaltung von Thiocestern, nicht jedoch von Hydroxylestern von Fettsäuren zu erwarten.

Beispiel 5

Induktion von alkalischer Phosphatase im Zelltest (Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase)

5000 Zellen der murinen mesenchymalen pluripotenten Linie C3H10T1/2 (ATCC CCL-226) wurden pro Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte eingesät. Die Zellen befanden sich in 100 µl DMEM, 2mM Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10 % fötalem Kälberserum, FKS. Am nächsten Tag wurden die zu untersuchenden Wirkstoffe in den entsprechenden Konzentrationen in einem Volumen von 100 µl zugefügt. Nach 5 Tagen wurde der Test gestoppt. Dazu wurden die Überstände abgkippt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden lysiert in 50 µl 0.1 % Triton® X-100 und bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 25 µl für die Proteinbestimmung und 25 µl für die Bestimmung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase eingesetzt.

Proteinbestimmung nach der Anleitung des Herstellers Pierce :

Der Ansatz wurde mit 75 µl H₂O bidest. versetzt, dann wurden 100 µl BCA Protein Reagenz zugefügt (Pierce Micro BCA, Nr. 23225). Nach 60 min wurde die Optische Dichte (O.D.) bei 550 nm gemessen.

Aktivität der Alkalischen Phosphatase nach der Anleitung des Herstellers Sigma :

Der Ansatz wurde mit 100 µl Reaktionspuffer (Sigma 221) versetzt. Eine Substratkapsel (Sigma 104-40) wurde in 10 ml H₂O bidest. aufgelöst, dann wurden 100 µl zu dem Testansatz pipettiert. Die O.D. wurde nach der Gelbfärbung bei 405 nm gemessen. Bei der Reaktion setzt die Alkalische Phosphatase p-Nitrophenyl-phosphat zu p-Nitrophenol um.

Die O.D. wurden jeweils mittels Standardkurven in nmol bzw. µg umgerechnet. Die Auswertung erfolgte nach der Formel :

$$\text{nmol PNP pro (Meß)Minute pro mg (Zell)Protein}$$

Beispiel 6

Vergleich der spezifischen Aktivitäten von unmodifiziertem hShh aus *E. coli* mit aus BVCM gereinigtem hShh-Derivat

Zum Vergleich der spezifischen Aktivitäten der diversen hh-Formen wurde hh-Protein in definierter Konzentration in den C3H10T $\frac{1}{2}$ Zelltest eingesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte dabei für das unmodifizierte hh-Protein aus *E. coli* über dessen UV-Absorption bei 280 nm (Mach, H., et al., Anal.Biochem. 200 (1992) 74-80). Die Konzentration des aus dem Baculovirus-Fermentationsüberstand gereinigten hh-Derivates wurde mittels RP-HPLC bestimmt. Die Konzentration in der Stammlösung wurde durch Flächenintegration unter der Absorptionskurve des hh-peaks bei RP-HPLC ermittelt, wobei bei 220 und 280 nm detektiert wurde und eine Eichkurve durch analoge Chromatographie mit Stammlösungen von unmodifizierten shh bekannter Konzentration erstellt wurde. Die relative Aktivität der isolierten shh Proteine wurde im C3H10T $\frac{1}{2}$ Zelltest bestimmt, indem die Stimulation der Expression der alkalischen Phosphatase in diesen Zellen (Beispiel 5; Zelltest) im Vergleich zu dem in einer 1:40 Verdünnung eingesetztem Baculovirus-Fermentationsüberstand (BVCM, nach 24-stündiger Fermentation) bestimmt wurde, wobei die einzelnen Werte gegen die Basisaktivität der Zellen in Abwesenheit von zugegebenen shh konigiert worden sind. Diese relative Aktivitätsbestimmung ist zu bevorzugen, da die Stimulierbarkeit der Zellen von dem verwendeten Medium und der Vorkultivierung der Zellen beeinflußt wird.

Tabelle 2 zeigt die relativen Aktivitäten von gereinigtem, unmodifizierten shh aus *E. coli* und dem aus dem Überstand des Baculovirus-Fermentationsüberstand gereinigten shh-Derivates, daß durch Chromatographie an Heparin-Sepharose, Hydroxylapatit und Poros HS/M angereichert worden ist.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, muß aus *E. coli* gereinigtes hh-Protein in einer Konzentration von ca. 240 µg/ml, das hh-Protein-Derivat jedoch nur in einer Konzentration von ca. 2,3 ng/ml im Zelltest vorliegen, um die gleiche Alk. Phos. Aktivität zu erzielen, wie der BVCM in einer 1:40 Verdünnung. Das hh-Protein-Derivat besitzt also gegenüber dem unmodifizierten hh-Protein eine um ca. den Faktor 10^4 - 10^5 höhere spezifische Aktivität.

Tabelle 2

| Hh-Quelle | Hh-Konzentration der Stammlösung | Verdünnung im Zelltest | Hh-Konzentration im Zelltest | relative AP induzierende Aktivität |
|--|----------------------------------|------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| BVCM | 12 µg/ml | 1:40 | 0,3 µg/ml | 1 |
| Poros HS/M gereinigtes hShh-Derivat | 0,56 µg/ml | 1:100 | 5,6 ng/ml | 2,4 |
| unmodifiziertes hShh-Monomer aus E. coli | 860 µg/ml | 1:20 | 43 µg/ml | 0,18 |
| Pufferkontrolle | - | 1:40 | - | 0 |

Beispiel 7

in vivo Aktivität von palmitinylierten hh

Die in vivo Aktivität von modifiziertem und unmodifiziertem shh Protein wurde in einem für Knochenwachstumsfaktoren etablierten Tiermodell untersucht (Mackie & Trechsel, Bone 11 (1990) 296; Kling, L., et al., J. Bone Min. Res. 11 (Suppl.1) (1996) 153). Sieben Wochen alten weiblichen BALB/c Mäusen wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen täglich 1, 10 oder 50 µg shh in einem Volumen von 50 µl subkutan an die Schädelkalotte injiziert. 14 Tage nach Beendigung der Behandlung wurden die Kalotten entnommen und von umgebendem Bindegewebe gereinigt. Anschließend wurden die Gewichte der normierten Explantate und die Röntgendichte analysiert. Modifizierter shh zeigte im Vergleich zu unmodifiziertem shh eine höhere osteoanabole Wirkung.

Ergebnisse:

- Shh (Monomer) aus E. coli in einer Konzentration von 43 µg/ml (= 2,15 µmol/l) im Zelltest gibt 8,537 nmol pNP/min/mg
- Shh (Dimer) aus E. coli in einer Konzentration von 41,5 µg/ml (= 1,037 µmol/l) im Zelltest gibt 5,133 nmol pNP/min/mg
- erfindungsgemäße hh-Mutante in einer Konzentration von 0,1 µg/ml (= 5 nmol/l)

M 17.12.98

- 18 -

- mit 0,1 mg/ml Suramin im Zelltest gibt 88,762 nmol pNP/min/mg
- erfindungsgemäße hh-Mutante in einer Konzentration von 0,1 µg/ml (= 5 nmol/l)
ohne Suramin im Zelltest gibt 44,828 nmol pNP/min/mg
- Kontrolle ohne Shh gibt 1,292 nmol pNP/min/mg
- in 1/40 Verdünnung eingesetzter BVCM gibt 41,961 nmol pNP/min/mg
(= interne Positivkontrolle)

Referenzliste

- Asahina, J., Exp. Cell. Res. 222 (1996) 38 - 47
- Bitgood, M.J. et al., Curr. Biol. 6 (1996) 296
- Bumcrot et al., Mol. Cell. Biol. (1995) 2294 - 2303
- Cha et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 10577 - 10582
- Chiang, C. et al., Nature 383 (1996) 407
- Fietz, M. et al., Development (Suppl.) (1994) 43 - 51
- Hynes, M. et al., Neuron 15 (1995) 35 - 44
- Karablis et al., Genes and Development 8 (1994) 277 - 289
- Kinto et al., FEBS Letters, 404 (1997) 319 - 323
- Kling et al., J. Bone Min. Res. 11 (Suppl. 1) (1996) 153
- Lai, C.J. et al., Development 121 (1995) 2349.
- Mach, H., et al., Anal. Biochem. 200 (1992) 74-80
- Mackie & Trechsel, Bone 11 (1990) 296
- Miao et al., J. Neurosci. 17 (1997) 5891 - 5899
- Nakamura, T. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 237 (1997) 465 - 469
- Perrimon, N., Cell 80 (1995) 517 - 520
- Porter, J.A. et al., Science 274 (1996) 255 - 259
- Smith, J.C., Cell 76 (1994) 193 - 196
- US-Patent 5,364,839
- Vortkamp, A. et al., Science 273 (1996) 613
- WO 97/35607
- WO 93/00050
- WO 95/16035
- Wozney et al., Cell. Mol. Biol. of Bone, Bone Morphogenetic Proteins and their Gene Expression, 131 - 167, Academic Press Inc. 1993

17.12.98

- 19 -

Patentansprüche

1. Posttranslational prozessierte Hedgehog-Protein-Mutante, welche erhältlich ist durch Expression eines Gens, welches ein Hedgehog-Protein codiert, in einem Bacculo-Virus-Expressionssystem, bei einer Fermentation über einen Zeitraum von bis zu 30 Stunden, Reinigung des Zellüberstands, in Gegenwart eines Proteaseninhibitors und eines nicht-ionischen Detergenz und Isolierung der hh-Mutante, welche an Heparinsepharose und Hydroxylapatit bindet und dadurch gekennzeichnet ist, daß diese hh-Mutante
 - unter alkylierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 22 ± 1 kDa zeigt,
 - unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 24 ± 1 kD zeigt,
 - in ihrer Aktivität durch Suramin stabilisiert wird,
 - bei einer N-terminalen Abspaltung von 8 oder mehr Aminosäuren inaktiviert wird,
 - bei einer Inkubation mit 10 mmol/l DTE über 2,5 Stunden bei 37°C zu 90 % oder mehr inaktiviert wird,
 - in einer Konzentration von 5 nmol/l, in Gegenwart von Suramin, eine Aktivität für alkalische Phosphatase von ca. 90 nmol pNP/min/mg induziert und
 - nicht cholesterinmodifiziert ist.
2. Verfahren zur Herstellung einer posttranslational prozessierten Hedgehog-Protein-Mutante durch Expression eines Gens, welches ein Hedgehog-Protein codiert, in einem Bacculo-Virus-Expressionssystem, bei einer Fermentation über einen Zeitraum von 24 - 27 Stunden, Reinigung des Zellüberstands, in Gegenwart eines Proteaseninhibitors und eines nicht-ionischen Detergenz und Isolierung der hh-Mutante, welche an Heparinsepharose und Hydroxylapatit bindet und dadurch gekennzeichnet ist, daß diese hh-Mutante
 - unter alkylierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 22 ± 1 kDa zeigt,
 - unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 24 ± 1 kD zeigt,
 - in ihrer Aktivität durch Suramin stabilisiert wird,
 - bei einer N-terminalen Abspaltung von 8 oder mehr Aminosäuren inaktiviert wird,
 - bei einer Inkubation mit 10 mmol/l DTE über 2,5 Stunden bei 37°C zu 90 % oder mehr inaktiviert wird,

- in einer Konzentration von 5 nmol/l, in Gegenwart von Suramin, eine Aktivität für alkalische Phosphatase von ca. 90 nmol pNP/min/mg induziert und
 - nicht cholesterinmodifiziert ist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß nach der Chromatographie an Heparinsepharose eine Dialyse gegen niedrige Ionenstärken durchgeführt wird.
 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Dialyse in Gegenwart von 10 - 100 mmol/l Natriumchlorid durchgeführt wird.
 5. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend eine hh-Mutante nach Anspruch 1.
 6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, enthaltend Suramin, eine biokompatible Matrix und/oder ein Sequestrierungsmittel.
 7. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung durch Kombination einer hh-Mutante gemäß Anspruch 1 mit einem pharmazeutischen Hilfsstoff oder mit Suramin.
 8. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung durch Kombination einer hh-Mutante nach Anspruch 1 mit einer biokompatiblen Matrix und/oder einem Sequestrierungsmittel.
 9. Posttranslational prozessiertes Hedgehog-Protein mit einer mindestens um den Faktor 100 höheren Aktivität als in E.coli hergestelltes cytoplasmatisches Hedgehog-Protein.
 10. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend ein Hedgehog-Protein nach Anspruch 9.
 11. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß als wesentlicher Bestandteil dieser pharmazeutischen Zusammensetzung ein Hedgehog-Protein nach Anspruch 9 verwendet wird.

M 17.12.98

- 21 -

Zusammenfassung

Eine posttranslational prozessierte Hedgehog-Protein-Mutante, welche

- unter alkylierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 22 ± 1 kDa zeigt,
- unter reduzierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 24 ± 1 kD zeigt,
- in ihrer Aktivität durch Suramin stabilisiert wird,
- bei einer N-terminalen Abspaltung von 8 oder mehr Aminosäuren inaktiviert wird,
- bei einer Inkubation mit 10 mmol/l DTE über 2,5 Stunden bei 37°C zu 90 % oder mehr inaktiviert wird,
- in einer Konzentration von 5 nmol/l, in Gegenwart von Suramin, eine Aktivität für alkalische Phosphatase von ca. 90 nmol pNP/min/mg induziert und
- nicht cholesterinmodifiziert ist,

zeigt eine vielfach erhöhte Aktivität.

M 17.12.98

Fig. 1

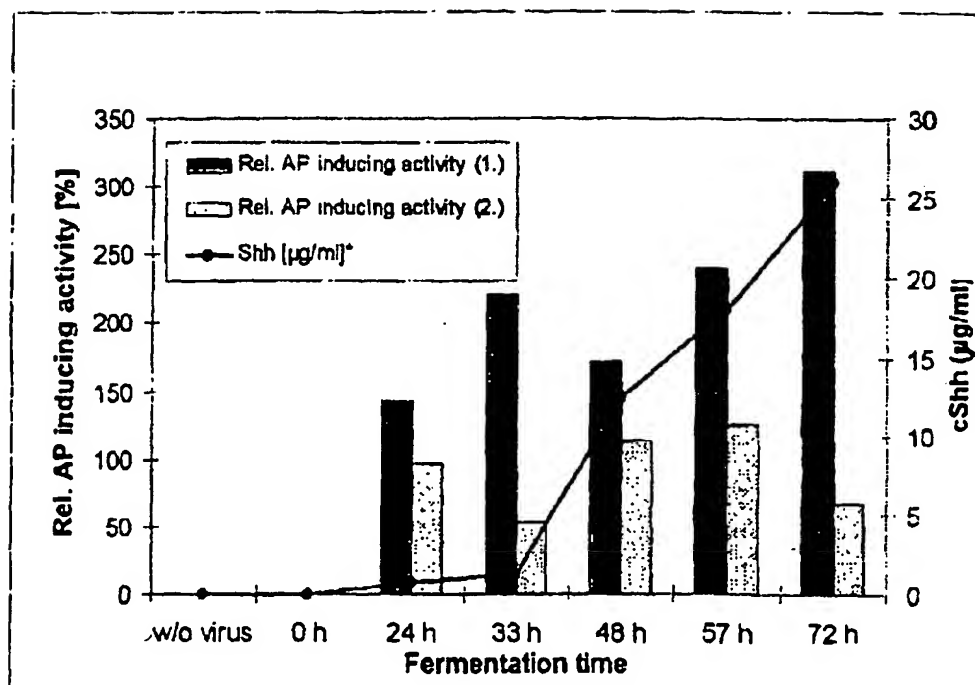


Fig. 2



17.10.98

Fig. 3

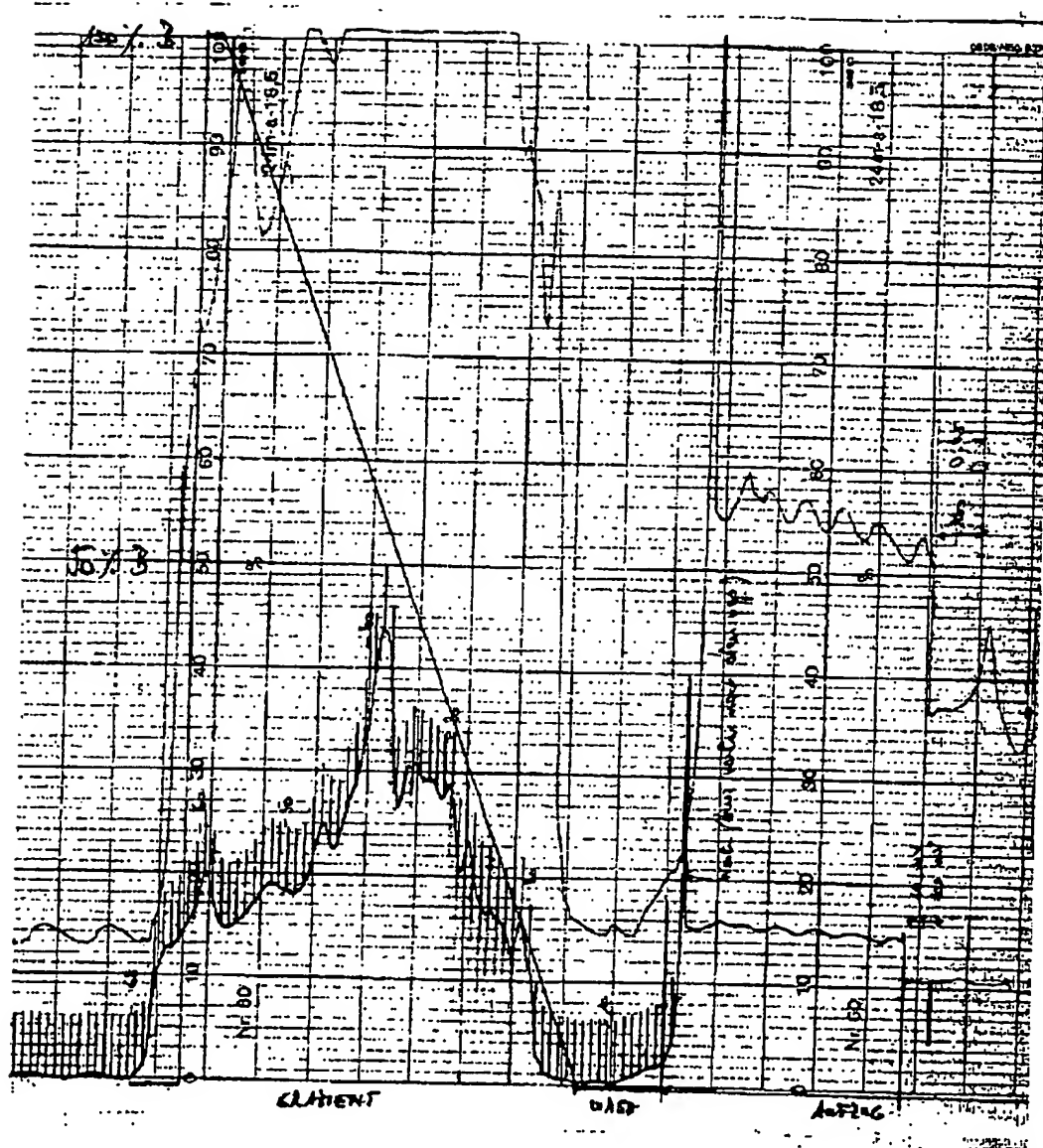
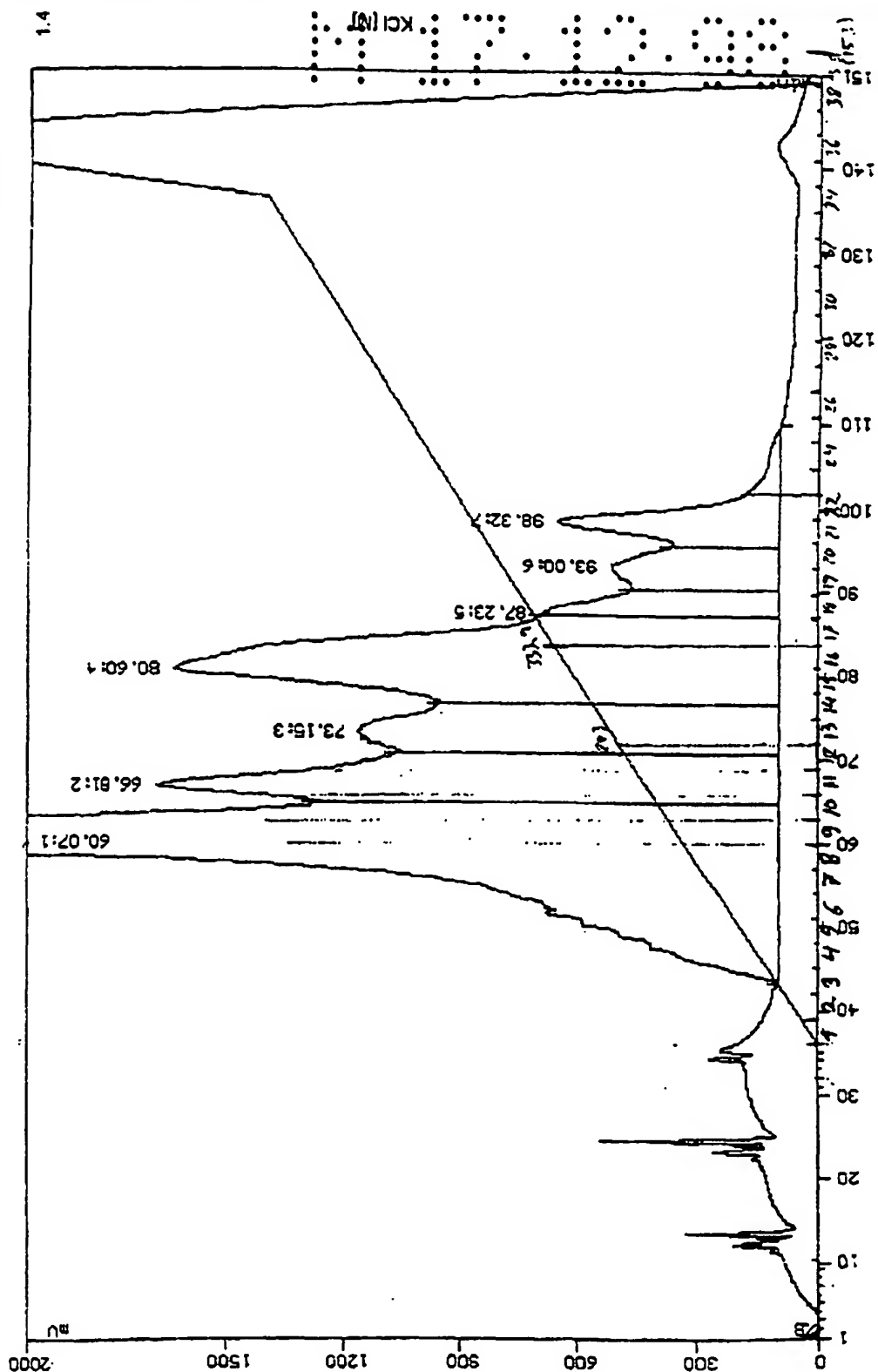
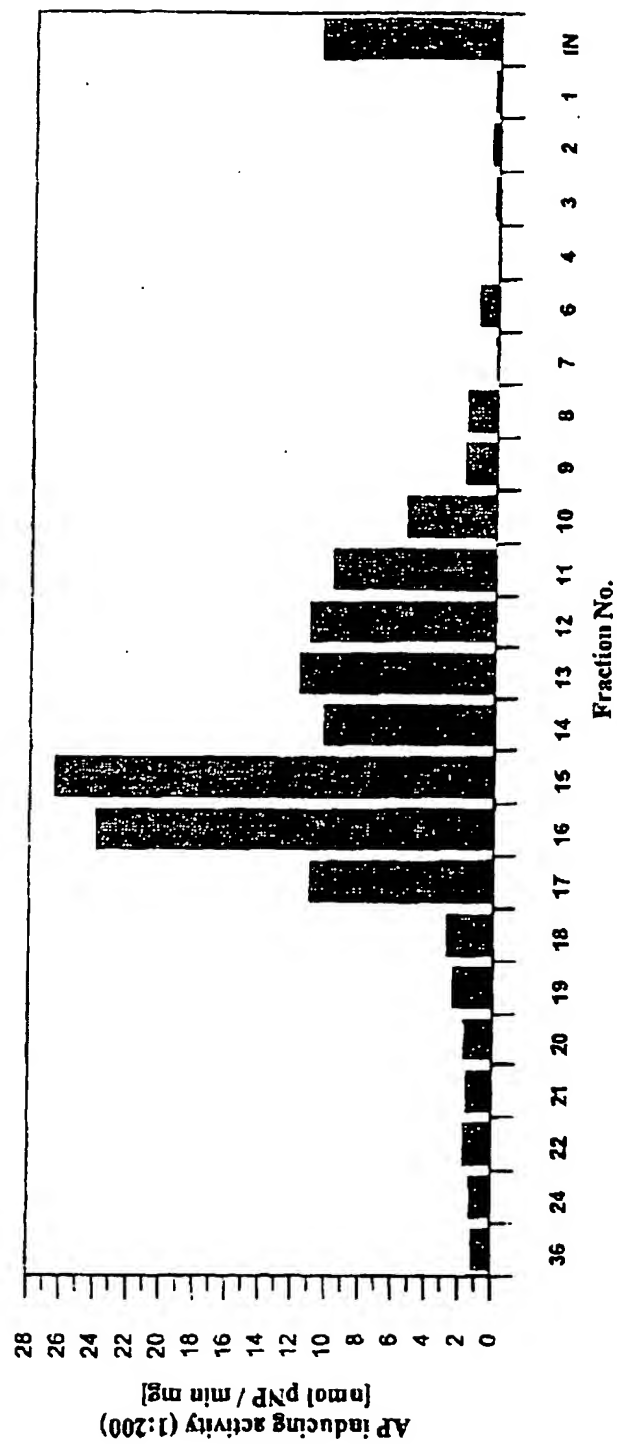


Fig. 4



AP 17.12.98

Fig. 5

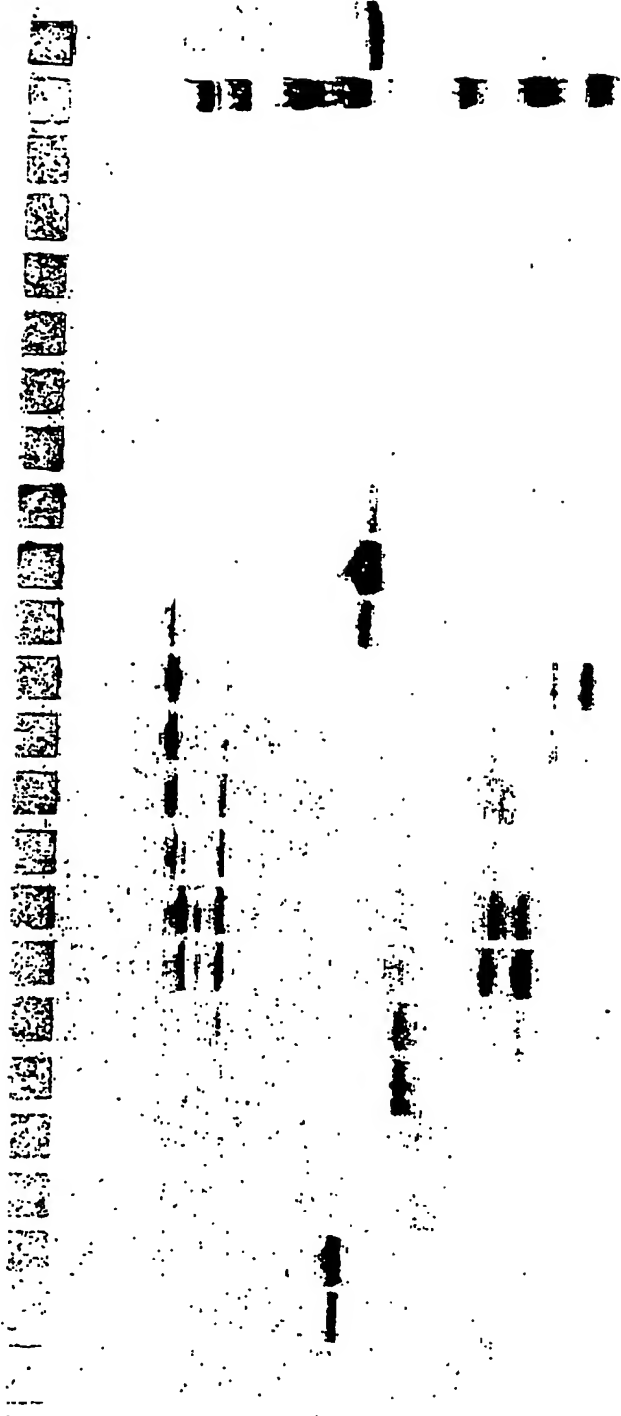


7/15

M 17 . 10 . 98

Fig. 6

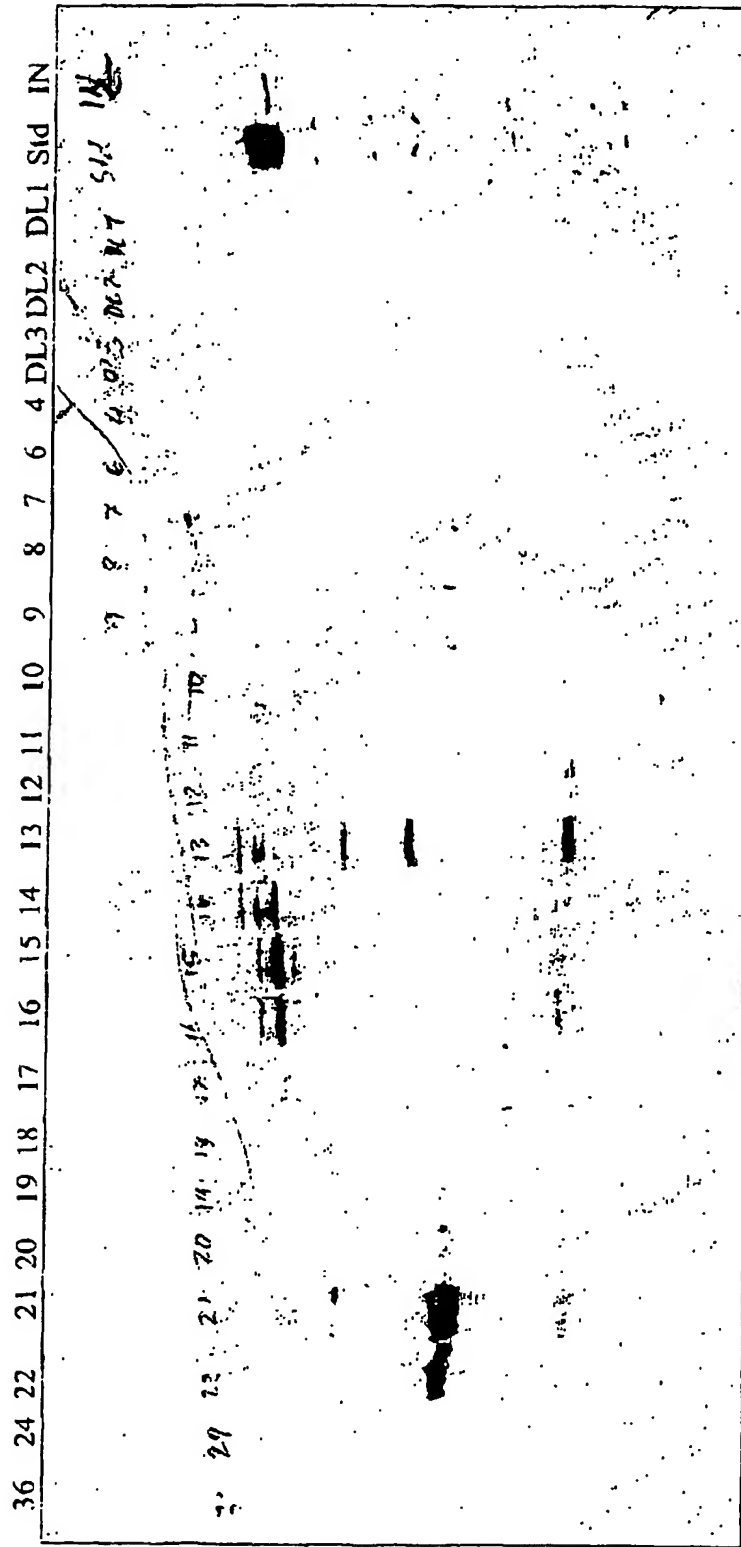
36 24 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 4 DL3DL2 DL1 Std IN



6/17

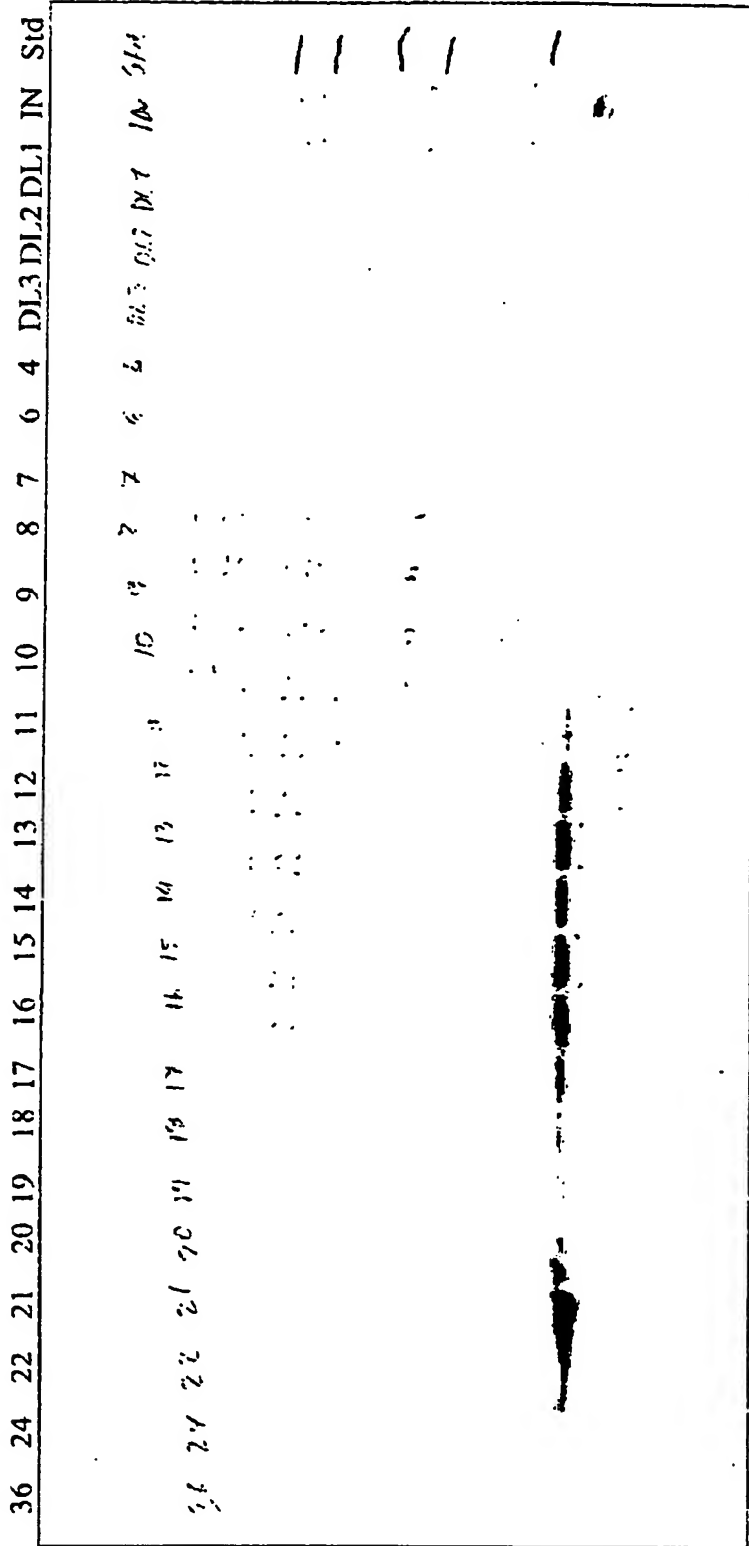
17.10.98

Fig. 7



7/17

Fig. 8

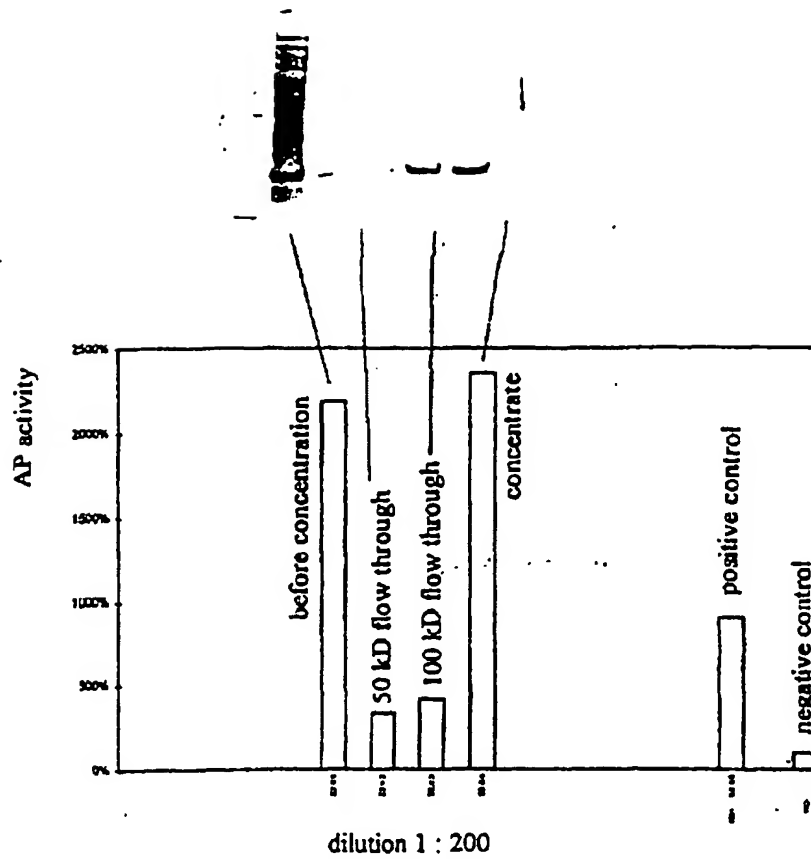


8/17

17.12.98

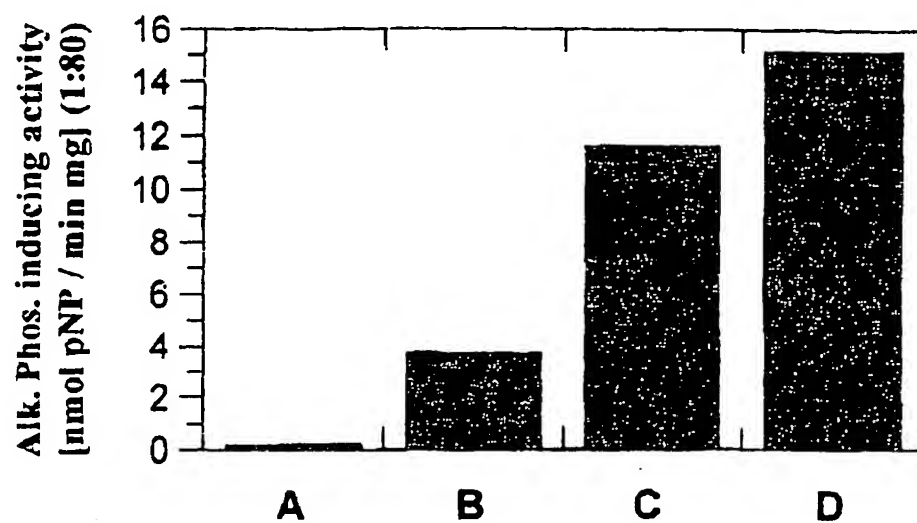
M 17. 10. 98

Fig. 9



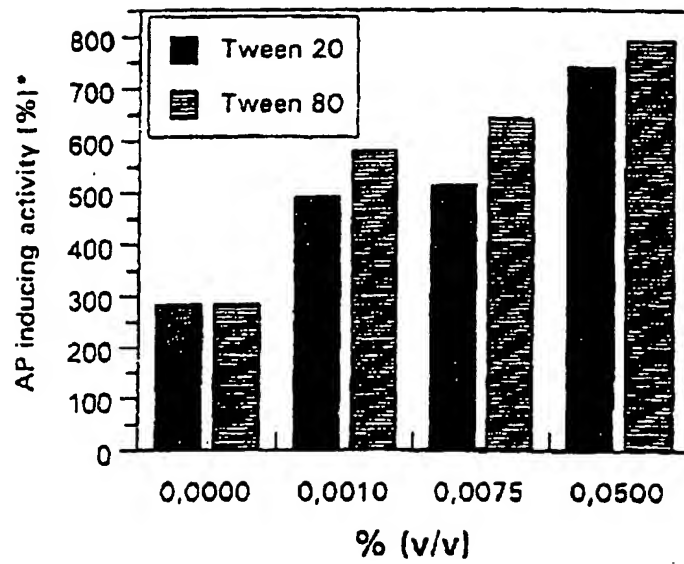
M 17.12.98

Fig. 10



M 17.12.98

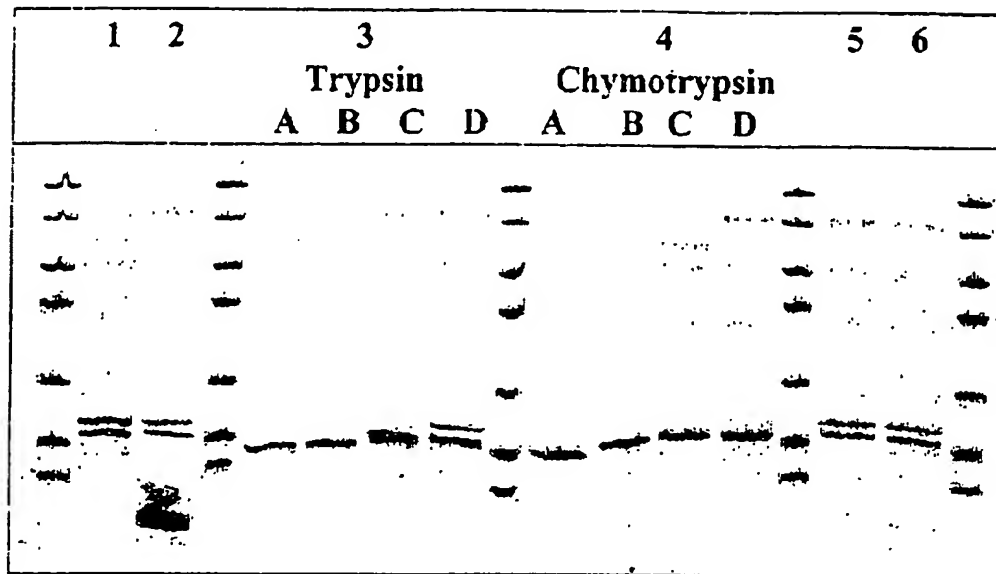
Fig. 11



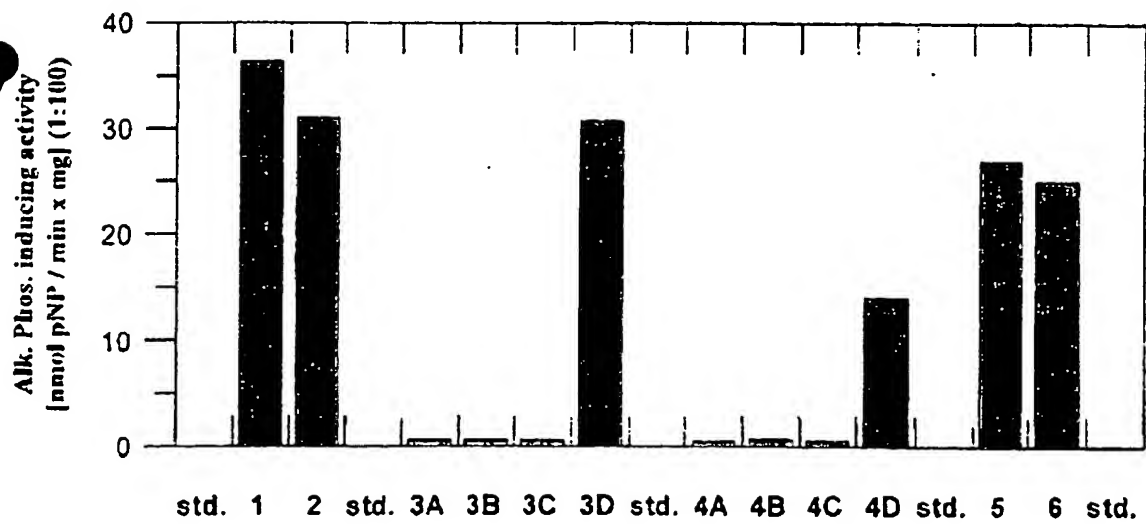
M 17.12.98

Fig. 12

A:

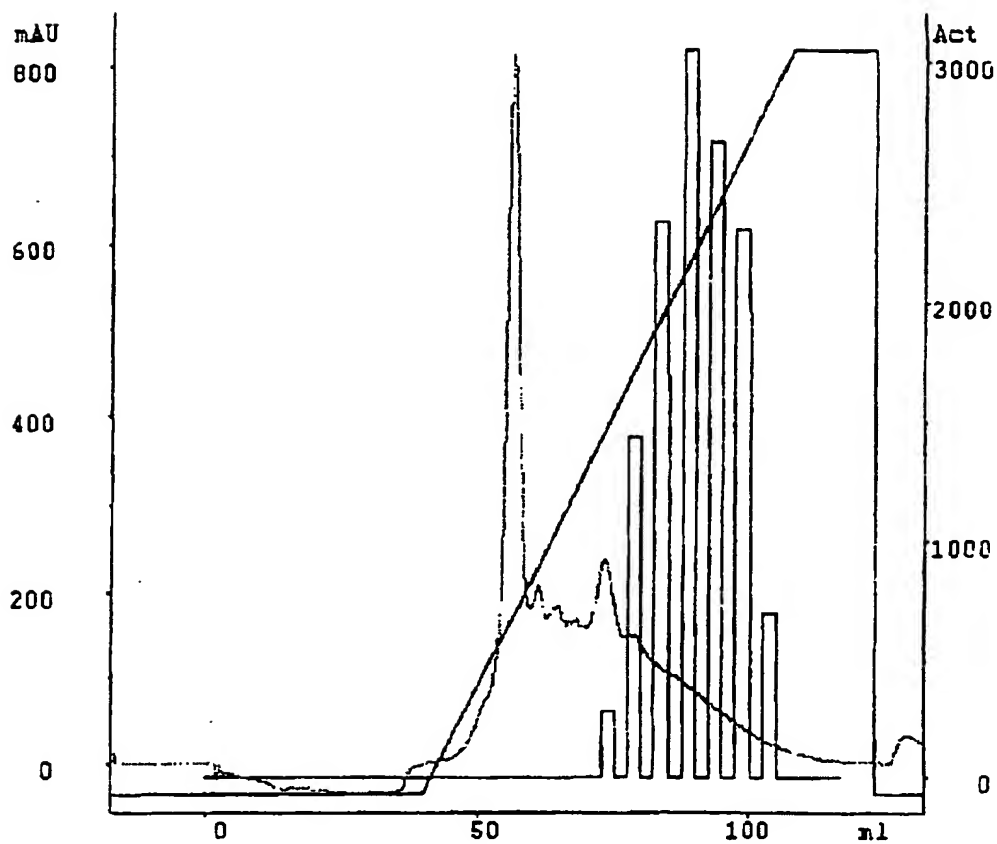


B:



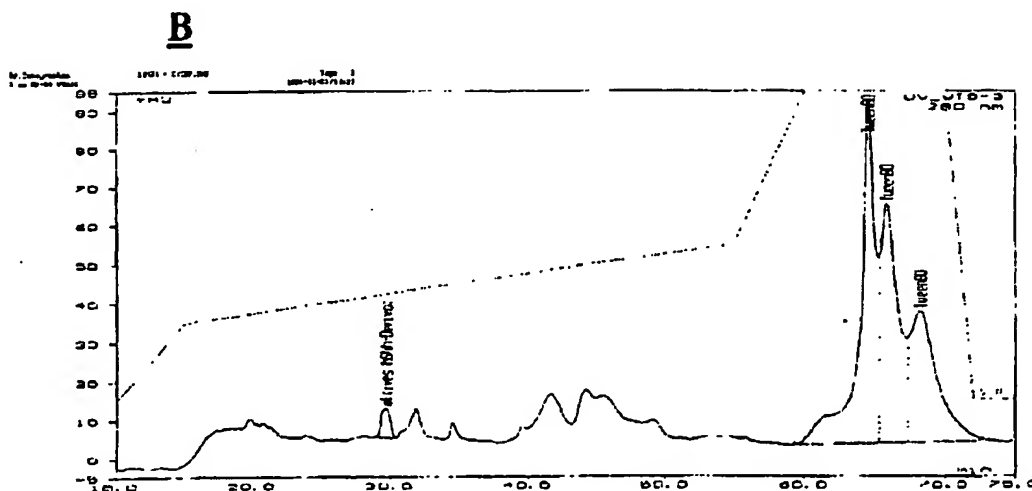
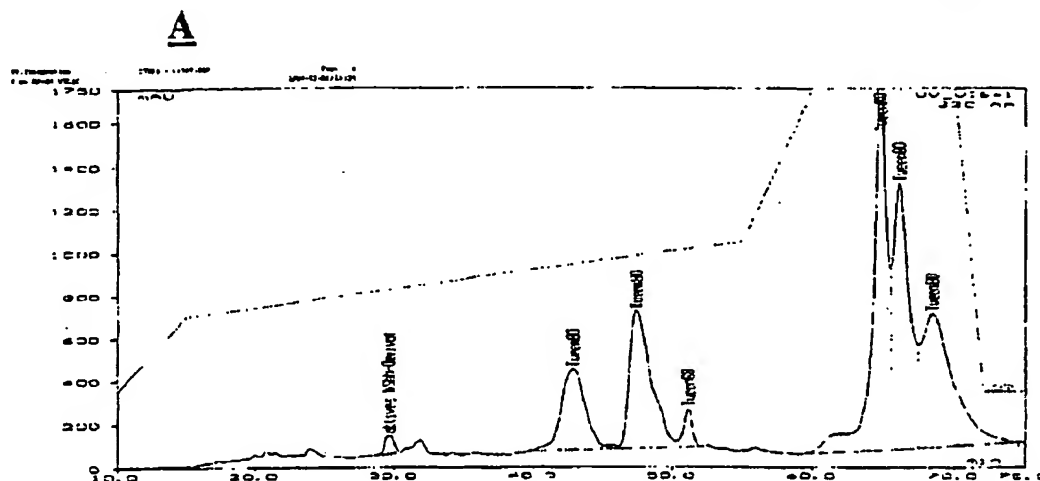
M 17.12.98

Fig. 13



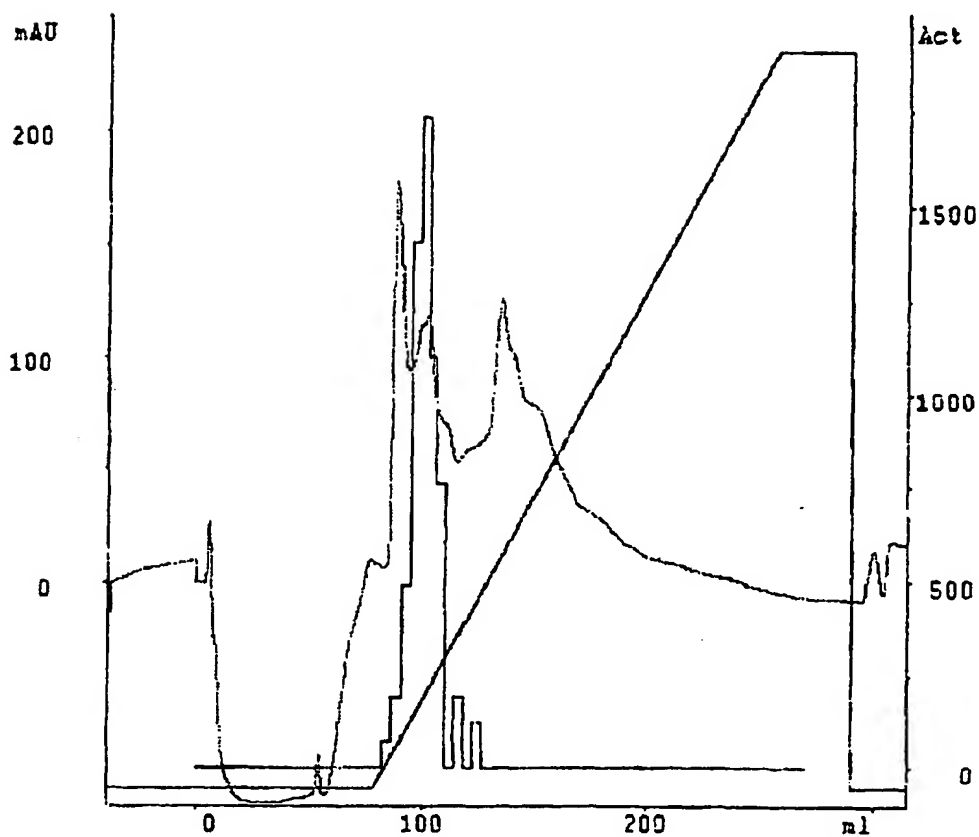
M 17.10.98

Fig. 14



M 17.12.98

Fig. 15



M 17. 10. 99

Fig. 16

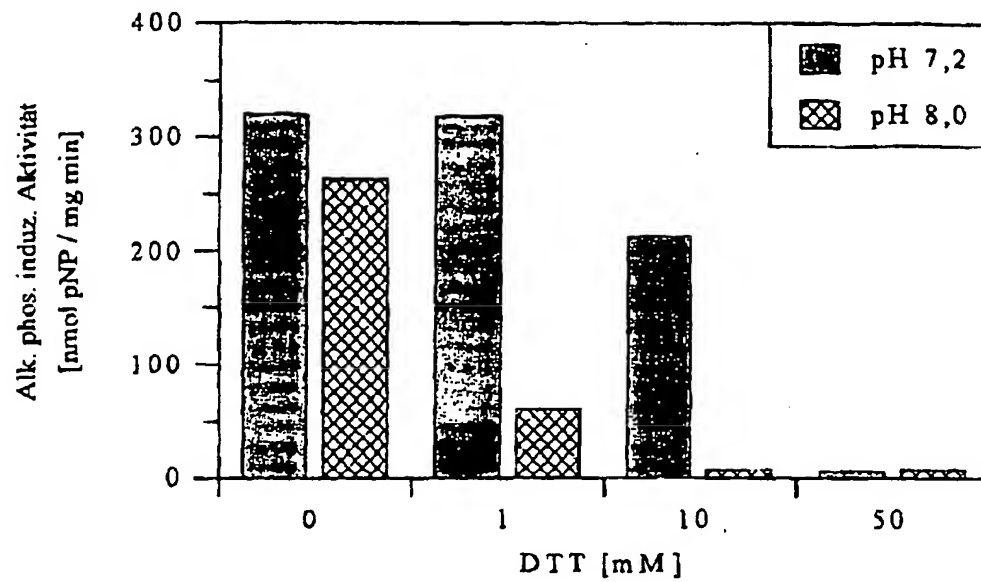
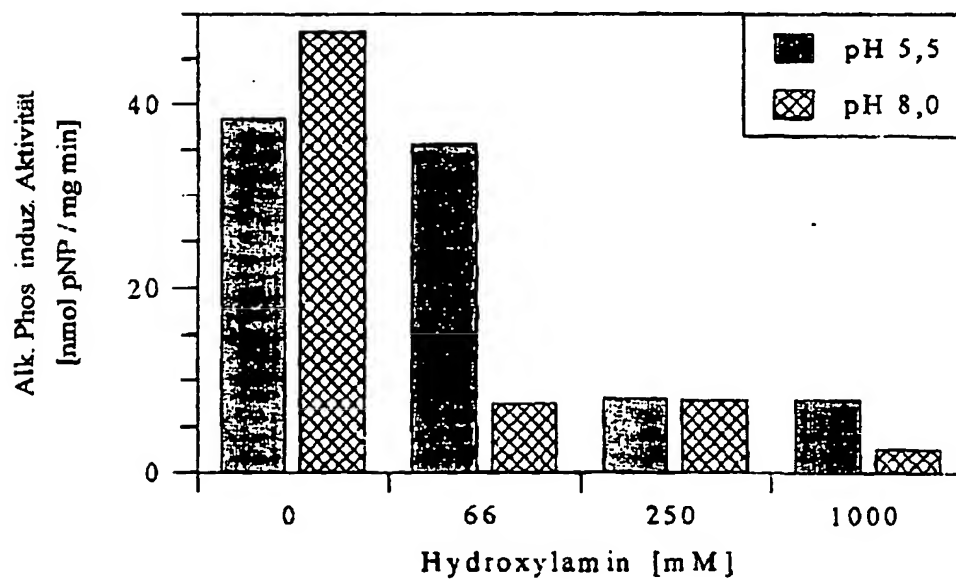
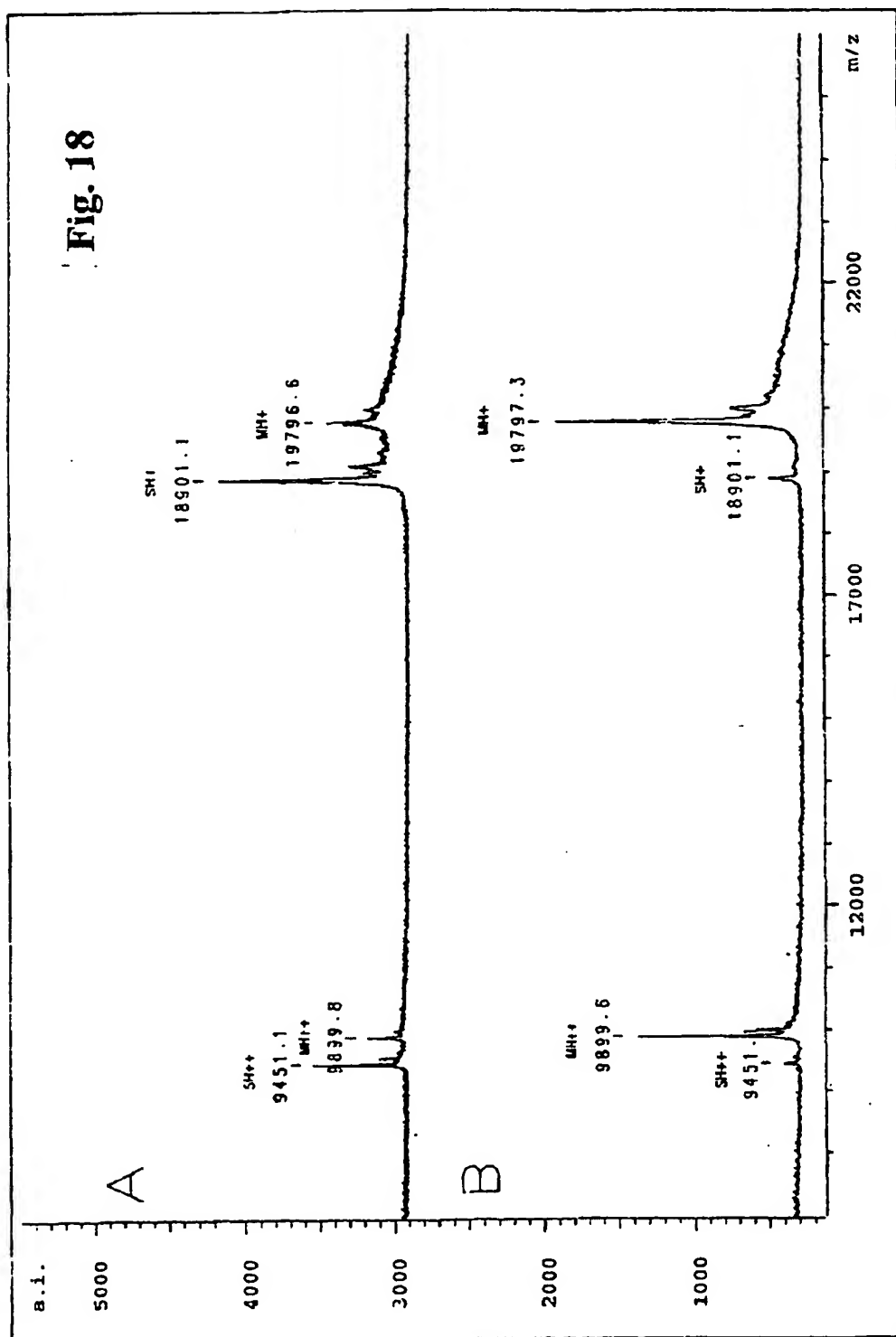


Fig. 17



M 17.10.98



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.